

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Asociación entre el desarrollo del páncreas endocrino
fetal y los niveles de glucosa séricos fetal y maternal en
alpacas**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Johan Jared Huaynates Orellana

ASESOR

Juan Antonio Espinoza Blanco

Lima - Perú

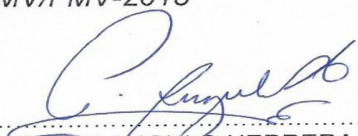
2015



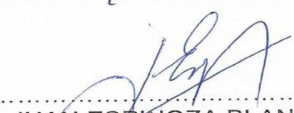
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 151-EAPMV/FMV-2015


PRESIDENTE :


PEDRO ANGULO HERRERA

MIEMBROS :


JUAN ESPINOZA BLANCO
Asesor de la Tesis


ALEXEI SANTIANI ACOSTA


MARIA VÁSQUEZ CACHAY

San Borja, 10 de diciembre de 2015

V° B°

.....
MV. Mg. HERMELINDA RIVERA GERONIMO
Directora de la Escuela Académico Profesional de
Medicina Veterinaria





ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **jueves 10 de diciembre de 2015**, a las **10:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **151-EAPMV/FMV-2015**, integrado por los siguientes profesores:

PEDRO ANGULO HERRERA
JUAN ESPINOZA BLANCO
ALEXEI SANTIANI ACOSTA
MARÍA VÁSQUEZ CACHAY

Presidente del Jurado
Asesor de la Tesis
Miembro del Jurado
Miembro del Jurado

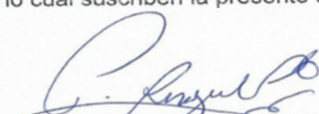
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **HUAYNATES ORELLANA, JOHAN JARED**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

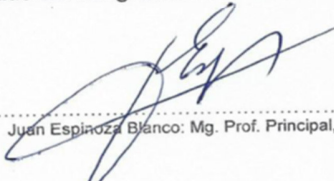
"ASOCIACIÓN ENTRE EL DESARROLLO DEL PÁNCREAS ENDOCRINO FETAL Y LOS NIVELES DE GLUCOSA SÉRICOS FETAL Y MATERNAL EN ALPACAS"

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **11:00 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Pedro Angulo Herrera: Dr. Prof. Principal, T.C.


Juan Espinoza Blanco: Mg. Prof. Principal, D.E.


Alexei Santiani Acosta: Dr. Prof. Asociado, T.P.


María Vásquez Cachay: Mg. Prof. Asociado, D.E.



DEDICATORIA

A Jehová, por todo lo que me permite hacer, y por permitirme llegar a conocerlo.

A mis padres, por todo, muchas gracias

A mis hermanos (Gazelle, Suzell, Abelardo, Sigfrid) por su apoyo, y por que nunca me dejan solo, en nada.

A una persona muy especial, por confiar en mi, Evelyn.

A mis buenos amigos (Juanca, Siman, Chato, Vejiga, Puma, Oswaldo, Jeanete, Berni), y a todos los Jotas.

A Tilsa y al terrible Jamqu'c.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Antonio Espinoza Blanco por su amistad, consejos y guía para realizar este trabajo de tesis.

A los Doctores José Luis Rodríguez Gutiérrez, Maria Vásquez por sus consejos y por ayudarme en la ejecución de este trabajo de Tesis.

A los Laboratorios de Farmacología y Toxicología Veterinaria, Fisiología Veterinaria por acogerme para realizar mis experimentos y brindarme los materiales necesarios.

A mi alma mater, la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por todos los conocimientos y experiencias adquiridas a lo largo de la carrera y que me serán útiles el resto de mi vida.

El presente estudio fue financiado con fondos provenientes de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y del Proyecto N° 173- FINCyTIB-2013, Lima-Perú

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1) Camélidos Sudamericanos: Alpacas	2
2.2) Glucosa en Alpacas.....	3
2.2.1) Metabolismo de la glucosa en la alpaca	3
2.2.2) Metabolismo energético en la vida fetal.....	4
2.2.3) Efecto del metabolismo energético maternal sobre el metabolismo fetal	5
2.2.4) Determinación de los niveles de glucosa en suero	6
2.2.4.1) Espectrofotometría.....	7
2.3) PÁNCREAS	8
2.3.1) Páncreas endocrino	8
2.3.1.1) Anatomía del Islote de Langerhans	9
2.3.2) Desarrollo de las células del Islote.....	10
2.3.2.1) Células de páncreas endocrino	11
2.3.2.1.1) Células Alfa	11
2.3.2.1.2) Células Beta.....	12
2.3.2.1.3) Células D	14

2.3.2.1.4) Células PP	14
2.3.2.1.5) Células Epsilon.....	14
2.4) Páncreas en la etapa prenatal.....	15
2.4.1) Control transcripcional en el desarrollo del páncreas	16
2.4.2) Reguladores de los progenitores de células endocrinas pancreáticas	16
2.4.2.1) Pdx1	16
2.4.2.2) Ptf1a/p48	17
2.4.2.3) Ngn3	18
2.4.2.4) Pax/Arx	18
2.4.2.5) Factores de transcripción Nkx	19
2.4.3) Factores involucrados en la maduración de las células endocrinas pancreáticas	20
2.4.3.1) NeuroD/BETA2.....	20
2.4.3.2) MafA.....	20
2.4.3.3) Pdx1	21
2.5) Neogénesis de células B	21
2.5.1) Replicación de células B	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1) Lugar de estudio	24
3.2) Animales y muestras.....	24
3.3) Materiales.....	26
3.3.1) Equipos y materiales para el procesamiento y análisis bioquímico colorimétrico.	26
3.3.1.1) Reactivos y materiales	26
3.3.1.2) Equipos de laboratorio.....	26
3.3.2) Equipos y materiales para el procesamiento y estudio histológico.....	27
3.3.2.1) Reactivos y materiales	27
3.3.2.2) Equipos de laboratorio	27

3.4) Metodología.....	27
3.4.1) Animales y muestras	27
3.4.1.1) Toma de muestra para el estudio Histológico	28
3.5.2) Análisis de medición histológica	30
3.6) Análisis de datos	31
IV. RESULTADOS	32
V. DISCUSIÓN	35
VI. CONCLUSIONES.....	37
VII. LITERATURA CITADA.....	38

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo relacionar la glucemia maternal gestacional con la glucemia fetal y el desarrollo del páncreas endocrino fetal. Se utilizaron 18 alpacas gestantes y sus respectivos fetos, se agruparon de acuerdo a la edad de los fetos en 3 tercios de gestación. La relación entre los niveles de glucosa maternal y los niveles de glucosa fetal, N°IL/mm² fetal y el diámetro de los IL fetal fueron de un r: 0.98, 0.99, 0.93, respectivamente. Los niveles de glucosa fetal-maternal, N° IL/mm² y diámetro de los IL son significativamente ($p < 0.001$) mayores en el último tercio de gestación. Nuestros resultados indicarían que hay una influencia de la glucosa maternal en el desarrollo del páncreas endocrino fetal.

Palabras clave: Glucosa en suero, Islotes de Langerhans, glucemia materno-fetal, páncreas endocrino fetal.

ABSTRACT

The aim of this study was determine relationship of maternal glycemia with glycemia and development of fetal endocrine pancreas. Were performed in 18 pregnant alpacas and its respective fetus, grouped in 3 third of gestation. Relationship between glycemia materno-fetal, N°IL/mm2 fetal and IL fetal were of r: 0.98, 0.99, 0.93, respectively. Levels of glucose materno-fetal, N° IL/mm2 and IL diameter were different significatively ($p < 0.001$) in the late third gestation. Our results show the influence maternal glycemia on glycemia and development of endocrine pancreas fetal.

Keywords: Serum glucose, Islets of Langerhans, maternal-fetal glucose, fetal endocrine pancreas.

LISTA DE CUADROS

PÁG.

Cuadro N° 1. Coeficiente de Correlación entre glucosa maternal y los niveles de glucosa fetal, N°IL/mm² fetal y el diámetro de los IL fetal.....

51

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1. Medida del diámetro biparietal usando el Vernier.....	43
Figura 2. Diámetro de los IL en fetos de alpacas agrupados en 3 tercios de gestación. Letras distintas denotan diferencias significativas evaluadas por ANOVA-Duncan post hoc test (p<0.001).....	49
Figura 3. N° IL/mm ² en fetos de alpacas agrupados en 3 tercios de gestación. Letras distintas denotan diferencias significativas evaluadas por ANOVA-Duncan post hoc test (p<0.001).....	50
Figura 4. Glucemias fetales y maternas agrupadas en 3 tercios de gestación. Letras distintas denotan diferencias significativas evaluadas por ANOVA-Duncan post hoc test (p<0.001).....	50

I. INTRODUCCIÓN

Algunos estudios realizados en camélidos sobre el metabolismo de la glucosa reportan diferencias con otras especies. Es así que en contraste con los rumiantes, las llamas y las alpacas mantienen alta la concentración de glucosa en sangre (media: 7.0 mmol/l, rango: 4.6-8.9 mmol/l) mas similar a la de un animal no rumiante. Aunque hay algunas diferencias entre los rangos de laboratorio, todas muestran altas concentraciones para los camélidos en comparación con los rumiantes (Lassen *et al.*, 1986; Fowler y Zinkl, 1989; Kaneko, 1989). Las llamas y las alpacas también muestran una respuesta hiperglicémica extrema (concentraciones de glucosa en sangre >11.1-16.6 mmol/l) en respuesta a situaciones de estrés, incluso mínimas (Fowler y Zinkl, 1989; Cebra *et al.*, 2001a, b). En camélidos no hay estudios relacionados al metabolismo energético en la etapa fetal, sin embargo considerando que la morfogénesis y la diferenciación del páncreas y sus tipos celulares son muy conservados entre los vertebrados durante el desarrollo fetal.

Actualmente se viene estudiando la histomorfometría del páncreas endocrino durante su desarrollo postnatal en cuyes y alpacas (Rodríguez *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2015), a fin de entender mejor la fisiología del metabolismo energético en estas especies, pues tal vez al alterarse sea una de las causas de mortalidad neonatal. Sin embargo, en fetos de alpacas no se ha trabajado nada relacionado al metabolismo energético y su correlación que tendría con la glucemia maternal. De allí que le presente estudio tuvo por objetivo determinar la relación que existe entre la glucemia fetal, el desarrollo del páncreas endocrino fetal y la glucemia maternal en alpacas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1) Camélidos Sudamericanos: Alpacas

Los camélidos sudamericanos son especies de interés económico en las zonas altoandinas, pues estos animales utilizan extensas áreas de praderas naturales, que por lo general no son aprovechadas de manera eficiente por otras especies de interés productivo (Novoa y Flores, 1991).

La crianza de la alpaca, es patrimonio principalmente de Perú y Bolivia (Bustinza, 2001; FAO, 2005). La población actual de alpacas, llamas, vicuñas y guanacos se estima en 7.7 millones. El Perú es el país con la mayor población de camélidos (aproximadamente 5 millones), además de tener el mayor número de alpacas y vicuñas (Quispe *et al.*, 2009). La crianza está distribuida principalmente en Puno (55%), Cuzco (12%), Arequipa (10%) y Huancavelica (6%), y se encuentra en propiedad de pequeños productores (85%) (Sector Agrario, 2011).

En la actualidad las alpacas son criadas principalmente por la producción de fibra (FAO, 2005), y su crianza constituye fuente de trabajo para la población altoandina (Bustinza, 2001). Desde el punto de vista económico involucran a una población de 2.9 millones de habitantes que representa aproximadamente el 11% de la población nacional, y a unos 100,000 productores (Brenes *et al.*, 2001).

2.2) Glucosa en Alpacas

2.2.1) Metabolismo de la glucosa en la alpaca

El metabolismo de la glucosa en alpacas es poco conocido, pues sus condiciones energéticas son diferentes al de otras especies. En los rumiantes la concentración de glucosa en sangre (47-80 mg/dl) es baja comparado con los no rumiante (80-115 mg/dl, caballo; 85-150 mg/dl, cerdo) (Kaneko, 1989). En contraste con los rumiantes, las alpacas mantienen altos niveles de glucemia (media: 126 mg/dl) similar a los monogástricos. Aunque hay algunas diferencias entre los rangos de laboratorio, todas muestran altas concentraciones para las alpacas en comparación con los rumiantes (Lassen *et al.*, 1986; Fowler y Zinkl, 1989; Kaneko, 1989).

El estrés en llamas y alpacas ocasiona niveles glucémicos muy elevados (200-290 mg/dl) (Fowler y Zinkl, 1989; Cebra *et al.*, 2001a, b). Estos niveles en llamas y alpacas pueden ser explicados por una respuesta a la insulina lenta y moderada algo similar a una condición de diabetes (Cebra *et al.*, 2001a, b).

La hiperglucemia en camélidos podría deberse también a estados de ayuno o por la baja calidad de los alimentos que consume. En los rumiantes, la glucosa es derivada de la gluconeogénesis hepática usando propionato de la fermentación ruminal de los azúcares y almidones, mientras que en los camélidos los bajos niveles alimenticios de azúcares y almidón hacen que la producción de propionato sean mínimas y los aminoácidos también pueden ser sustrato para la gluconeogénesis. Los camélidos utilizan los aminoácidos para mantener el contenido de glucosa en sangre, que posiblemente explicaría las altas concentraciones de nitrógeno úrico sérico (SUN) observadas. Las pruebas de apoyo de esta

hipótesis procede de datos generados en un estudio de restricción alimenticia de lipidosis hepática (Tornquist *et al.*, 2001) en este estudio, la restricción alimentaría dio como resultado una disminución significativa en la concentración de nitrógeno úrico sérico a través del tiempo, concordante con las respuestas observadas en rumiantes.

Los niveles elevados de glucemia en alpacas, se explican mejor por la resistencia a la insulina. Por otra parte, los camélidos pueden metabolizar ácidos grasos volátiles de cadena corta (acetato y butirato), que se podría disponer fácilmente de la dieta basada en forraje mediante la fermentación en el intestino. Una combinación de estos factores podría dar una mejor explicación sobre la alta concentración de glucosa observada en camélidos (Van Saun, 2006).

2.2.2) Metabolismo energético en la vida fetal

Los requerimientos nutricionales del feto dependen del transporte placentario y de la alimentación materna (Kennaugh and Hay, Jr., 1987). Las necesidades energéticas del feto se determinan por la velocidad del metabolismo fetal, la velocidad del crecimiento fetal y la composición del tejido fetal formado. Así mismo, la velocidad de metabolismo fetal es muy similar entre las diferentes especies de mamíferos (Battaglia and Meschia, 1978).

La glucosa representa el 75% del sustrato energético total en el feto al final de la gestación. En fetos de mamíferos, se ha observado que la velocidad neta de captación de glucosa es proporcional a la que contenga la madre. Es así que durante la etapa fetal el sustrato más importante es la glucosa a diferencia de lo que ocurre en la etapa neonatal. En este sentido, la actividad de las enzimas responsables de la oxidación de ácidos grasos es relativamente baja durante la vida fetal (Bell and Coleman, 1980).

Se ha reportado que la velocidad de utilización de glucosa en el feto es el doble que en la rata gestante (Leturque *et al.*, 1986), datos similares al de la oveja, el conejo o el cerdo (Ford *et al.*, 1984).

2.2.3) Efecto del metabolismo energético maternal sobre el metabolismo fetal

La manipulación nutricional del feto a través de la restricción calórica, restricción proteica, sales o de hierro en la dieta materna o en la disminución en la disponibilidad fetal de oxígeno provoca en la vida adulta un mayor riesgo de hipertensión, obesidad, hipercolesterolemia, intolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina (Fowden *et al.*, 2006), y se relacionan, de forma directa o indirecta, con posibles cambios en el metabolismo fetal o neonatal que se originan en respuesta a las alteraciones nutricionales.

La privación de sustratos oxidativos como la glucosa conduce a una respuesta metabólica fetal que es diferente a las observadas en respuesta a la privación en oxígeno. Estas diferentes alteraciones nutricionales provocan también diferentes efectos en los tejidos utero-placentarios así como en el ambiente hormonal fetal, factores ambos que influyen la disponibilidad y el destino metabólico de los nutrientes específicos del feto (Fowden, 2003; Fowden and Forhead, 2004). La reducción de la ingesta calórica materna durante 2-7 días en la oveja causa una disminución en la concentración de glucosa fetal mientras que no se afectan ni los niveles de oxígeno arterial fetal (Hay, Jr. *et al.*, 1984; Fowden *et al.*, 1998a). En estas condiciones, aumentan las concentraciones fetales de urea y de diferentes aminoácidos gluconeogénicos (Liechty y Lemons, 1984). La malnutrición en la borrega produce oxidación de aminoácidos fetal para la producción de glucosa, y se reduce la disponibilidad de aminoácidos para la síntesis de proteínas lo que da lugar a un

disminuido crecimiento fetal. Estas observaciones indican que el feto se desarrolla mediante mecanismos que intentan mantener su metabolismo energético relativamente constante, mientras que el crecimiento es prescindible en condiciones con deficiente suministro energético. (Aldoretta y Hay Jr., 1999).

2.2.4) Determinación de los niveles de glucosa en suero

La determinación de glucosa sanguínea es una prueba muy frecuente en bioquímica y se puede llevar a cabo tanto por métodos químicos como enzimáticos, siendo estos últimos los más específicos (Burtis *et al.*, 1999).

Hay dos tipos de *métodos químicos*:

a) *Reductimétricos*, que se basan en la capacidad reductora de la glucosa.

Debido a la presencia en la muestra de otros compuestos reductores, estos métodos dan cifras superiores a las correspondientes a la glucosa verdadera.

b) *Furfuralicos*: se basan en la capacidad de la glucosa para formar furfural al sufrir deshidratación en un medio ácido. Un ejemplo es el método que emplea o-toluidina.

En cuanto a los *métodos enzimáticos*:

a) *Método de la hexoquinasa*: emplea las enzimas hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Por cada molécula de glucosa se forma una de NADPH, que puede medirse espectrofotométricamente a 340 nm. Es el método de referencia recomendado por las organizaciones internacionales.

b) *Método de glucosa oxidasa y peroxidasa (GOD-POD)*: El método GOD-POD, en un primer paso la **glucosa oxidasa** cataliza la oxidación de la D - glucosa a ácido D-glucónico con formación de peróxido de hidrógeno. Este es utilizado por la **peroxidasa** para oxidar a la 4- aminofenazona y al fenol, dando lugar a una quinonaimina coloreada. La intensidad de color será proporcional a la concentración de glucosa presente inicialmente

Los valores referenciales de glucosa en alpacas son de 128 ± 16 mg/dl, con un rango de 103 – 160 mg/dl (Bogin, 2000).

2.2.4.1) Espectrofotometría

Se refiere a proyectar un haz de luz monocromática a través de una muestra y medir la cantidad de luz que es absorbida, en función de la longitud de onda. Esto le permite realizar al operador dos funciones, primero, dar información sobre la naturaleza de la sustancia en la muestra y segundo indicar directamente que cantidad de la sustancia que nos interesa, está presente en la muestra (Bishop y Duben – Engelkirk, 1992).

Comparando la longitud de onda y la intensidad del máximo de absorción de luz de una muestra versus soluciones Standard, es posible determinar la identidad y la concentración de componentes disueltos en la muestra (solución incógnita). Las ventajas de la espectrofotometría sobre otros métodos analíticos de laboratorio son varias: es rápida, precisa, versátil, fácil de usar y accesible en costo (Connors, 1980).

2.3) PÁNCREAS

El páncreas es una glándula con función endocrina y exocrina, compuesto por 4 componentes: el tejido exocrino, los conductos, las células endocrinas y el tejido conectivo. Estos elementos están relacionados íntimamente en ontogenia, anatomía, histología y función.

El páncreas exocrino libera enzimas digestivas y bicarbonato dentro del duodeno, y está organizado en acinos que se abren en conductos intercalados, que están conectados por las células centro-acinares y finalmente forman el conducto pancreático principal de Wirsung, que junto con el conducto biliar común, se abren en el duodeno.

El páncreas endocrino (Islotes de Langerhans) controla los niveles de glucosa en la sangre y liberan hormonas en el torrente sanguíneo para mantener la homeostasis estable de la glucemia.

Los Islotes de Langerhans son pequeñas estructuras complejas, responsables de mantener la homeostasis de la glucosa. Los islotes contienen 5 diferentes tipos celulares, los cuales reaccionan con los cambios en los niveles de nutrientes en el plasma. Estos tipos celulares están caracterizados por la morfología que les confiere sus gránulos secretorios.

Los Islotes de Langerhans son de vital importancia para el cuerpo porque son los que producen insulina, el primer regulador de la homeostasis de la glucosa. El nombre “Islotes de Langerhans” fue acuñado por Edouard Laguesse (1861-1927) un histólogo que trabajó de la universidad de Lille, quien en un trabajo seminal en 1893, dedujo correctamente que están involucrados en la secreción endocrina. Paul Langerhans (1849-1888), quien fue el primero en describir esos grupos de células en su tesis doctoral en 1869

pero que fue incapaz de atribuirles una función específica (Volk y Wellman, 1985). Los Islotes varían de tamaño y rango de pequeños grupos de solo unas pocas células a grandes agregados con varios cientos de células. Depende de manera exacta que definición de Islote se tiene, el estimado del número de Islotes en un páncreas maduro varía de varios cientos de miles a varios millones (Rahier *et al.*, 2008).

Los islotes contienen principalmente cuatro tipos celulares: células Alpha, células Beta, células Delta y células PP (células pancreáticas polipéptidos, también llamadas células F o D1). Un quinto grupo celular, células Epsilon o Ghrelin han sido descritas recientemente (Wierup *et al.*, 2002; Wierup *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2002).

2.3.1.1) Anatomía del Islote de Langerhans

Las células endocrinas forman agregados de varios tamaños y aspectos microscópicos, y el tamaño del islote y el número de células β aumenta desde el nacimiento a la adultez (Meier *et al.*, 2008).

En fetos, los islotes están en contacto cercano con los conductos, pero ellos están más separados de los conductos en neonatos y adultos. En adultos, el 50% de los islotes permanece cerca de los conductos (Watanabe *et al.*, 1999). El tamaño y distribución de los islotes varía ampliamente de individuo a individuo, pero sin patrón reconocible, excepto que su número parece aumentar hacia la cola del páncreas (Saito *et al.*, 1978).

Dos arquitectónicamente diferentes tipos de islotes son reconocidos: el difuso y el compacto. En la cabeza postero-inferior del páncreas, los islotes son del tipo difuso, porque las trabéculas parecen más laxas que en los islotes que se encuentran en el resto del páncreas y que se conocen como islotes compactos. Los islotes difusos son muy ricos en

células PP y son más grandes que los islotes compactos. Ellos también contienen substancialmente menos células A, B y D que los islotes compactos (Orci *et al.*, 1976), que se encuentran principalmente en el cuerpo y en la cola y tienen tamaños que van desde 50 a 280 μm . Los islotes compactos están bien circunscritos y separados por una delgada capa de colágeno de los acinos que rodean. Esto es menos en el caso de los islotes difusos, los cuales a menudo son irregulares. Aunque ocasionalmente los islotes pueden medir 1-2 mm de diámetro, los islotes compactos más grandes que 250 μm son generalmente considerados hiperplásicos (Klimstra *et al.*, 2007).

Los diferentes tipos celulares del islote pueden ser distinguidos con tinciones especiales. En estos días la inmunohistoquímica es usada casi exclusivamente, pero existen varias tinciones histoquímicas específicas para diferenciar los tipos celulares. Las más conocidas son el tricómico de Gomori para células B (Gomori, 1939; Grimelius y Stand, 1974) y Hellman-Hellerstrom para células D (Hellerstrom y Hellman, 1960).

2.3.2) Desarrollo de las células del Islote

Actualmente, los factores de transcripción claves involucrados en el desarrollo del páncreas de ratón son similares al de humanos. En este sentido, la observación que las mutaciones homocigotas de Pdx1 resultan en agenesia pancreática congénita evidencia un claro rol de este factor de transcripción en el desarrollo del páncreas (Stoffers *et al.*, 1997). Así mismo, mutaciones heterocigotas con pérdida de función de Pdx1 ha sido asociado con diabetes tipo MODY4 (Stoffers *et al.*, 1997).

La disfunción de otros factores de transcripción también han sido vinculados con MODY (Olek, 2006). MODY1 es el resultado de mutaciones en el factor hepático nuclear

4-alfa (HNF4A) (Yamagata *et al.*, 1996). Mutaciones en el factor hepático nuclear 1-alfa resulta en MODY3. Los humanos con MODY3 sufren de defectos en uso de glucosa, secreción de insulina y eliminación de glucosa (Surmely *et al.*, 1998). MODY5 resulta de la mutación del factor hepático nuclear 1-alfa (Horikawa *et al.*, 1997). Mutaciones en el gen NeuroD1/BETA2 causa MODY6 (Malecki *et al.*, 1999).

Otros factores de transcripción que son importantes para el desarrollo del islote pancreático o para la función de diferenciación de las células B existen y son genes candidatos para desarrollar diabetes. Estos incluyen Pax4 e Isl1. Mutaciones heterocigotos en Pax4 y Isl1 están asociadas con el inicio tardío de diabetes (Shimajiri *et al.*, 2001; Shimomura *et al.*, 2009). El rol de Ngn3 en el destino de las células del islote no está claro. Un estudio reciente en genética humana plantea la posibilidad que las células B tal vez desarrollan sin la función de Ngn3 (Wang *et al.*, 2006).

2.3.2.1) Células de páncreas endocrino

Los islotes adultos contienen por lo menos cinco tipos diferentes de células endocrinas. Células A y B fueron descritas por primera vez en 1907 por Lane (Lane, 1907) en función de sus características histoquímicas de tinción, mientras que las células D fueron reconocidas por primera vez por Bloom en 1931. Las células PP (Kimmel *et al.*, 1971) y las células Ghrelin (Wierup *et al.*, 2002), ambas fueron descubiertas gracias a la ayuda de la inmunocitoquímica.

2.3.2.1.1) Células Alfa (α)

Las células α secretan glucagón, un péptido de 29 aminoácidos con acción hiperglucemiante. El péptido es derivado de proglucagón (180 aminoácidos) a

través de la descomposición proteica. Otros productos de la descomposición que puede derivar del precursor son GLP-1, GLP-2 y glicentina (Bell *et al.*, 1983; Vaillant y Lund, 1986). El glucagón es almacenado en gránulos secretores que tienen una morfología típica con un núcleo electrodense y un manto periférico grisáceo (Deconinck *et al.*, 1971). El glucagón fue localizado por inmunohistoquímica en las células A por Baum *et al.* (1962). El número de células A es estimado entre el 15-20% (Stefan *et al.*, 1982; Rahier *et al.*, 1983), sin embargo el volumen relativo tomado por las células A puede variar significativamente entre islotes con algunos islotes contienen más del 65% de células A (Brissova *et al.*, 2005). Las células A son más prominentes en la parte derivada del páncreas dorsal y virtualmente ausente en la parte derivada ventral.

2.3.2.1.2) Células Beta

El grupo celular de mayor abundancia en el páncreas endocrino está conformado por las células β (entre el 50 y 80% del total celular) (Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2006). Las células β secretan insulina, un péptido de 51 aminoácidos con una fuerte acción hipoglucémica. La insulina es esencial para la absorción de nutrientes celulares y para la supervivencia del organismo. Su aislamiento e inmediato éxito en la aplicación clínica en 1923 por Banting, Best y Collip fue uno de los mayores avances médicos del siglo XX (Banting y Best, 1922; Bliss, 1982).

La insulina deriva de la proinsulina, éste precursor biológicamente inactivo es dividido en tres partes, una cadena A y B, que se mantienen conectadas por dos

puentes de azufre, así forman la molécula biológicamente activa de insulina, y la cadena C (péptido conector), que es liberado junto con la insulina en relación molar 1:1 (Orci, 1986).

La célula β también secreta el Polipéptido Asociado al Islote (IAPP, también llamado Amilina), un péptido de 37 aminoácidos relacionado con el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Johnson *et al.*, 1988).

La célula β contiene de 9000-13000 gránulos secretorios (Olofsson *et al.*, 2002). Se estima que aproximadamente 1012 gránulos secretorios se liberan de las células β cada día. La liberación puede ocurrir a través de vías reguladas por nutrientes o a través de vías constitutivas. La activación inducida por nutrientes es iniciada a través del cierre de canales de potasio dependientes de ATP. El proceso de liberación de la insulina es compleja y en parte puede consistir en la fusión del granulo con la membrana plasmática y parte de la apertura temporal de pequeños poros entre la luz del granulo y el medio extracelular (Eliasson *et al.*, 2008).

El granulo secretorio contiene proinsulina, C-péptido, IAPP, zinc, enzimas proteolíticas, calcio, adenina nucleótidos, aminas biogénicas, y una serie de péptidos adicionales que incluyen a la cromogranina A y β -granina (Hutton *et al.*, 1988). Muchas proteínas de la membrana del granulo están implicadas en la autoinmunidad humoral en la diabetes tipo 1, como el transportador de zinc ZnT8 (Wenzlau *et al.*, 2007), proteína 2 asociada con insulinomas (IA-2; ICA-512) (Lan *et al.*, 1996), y descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65) (Baekkeskov *et al.*, 1990).

2.3.2.1.3) Células D

Las células D liberan somatostatina, aislada primero del hipotálamo (Brazeau *et al.*, 1973). Esta hormona peptídica es un potente inhibidor del glucagón y fue localizado por primera vez mediante inmunohistoquímica por Luft *et al.* (1974). Las células D forman del 5 al 10% del volumen del islote (Bloom y Polak, 1987).

2.3.2.1.4) Células PP

Son las menos estudiadas del islote. El péptido PP fue encontrado inmunocitoquímicamente en dos tipos celulares morfológicamente distintos: células PP inmunoreactivas (anteriormente designadas como células F), caracterizadas por gránulos secretorios redondos a angulares, fueron encontrados en la cabeza ventral del páncreas, mientras que las células con gránulos pequeños, antes llamadas células D1, fueron encontradas en la parte dorsal (Larsson *et al.*, 1974).

2.3.2.1.5) Células Epsilon

El último tipo celular que fue agregado es la célula epsilon o Grelina. La hormona grelina fue aislada del estómago de ratón y luego localizada en un tipo específico de célula en un islote adulto (Wierup *et al.*, 2002).

Los islotes de un adulto contienen menos de 1% de células epsilon. La hormona que secreta es de importancia en el aumento de la liberación de hormonas, regulación metabólica, y balance energético, pero su papel exacto en las células del islote aun no se ha establecido.

2.4) Páncreas en la etapa prenatal

Los órganos gastrointestinales, incluido el páncreas deriva de la capa germinal endodermal. La aparición del esbozo pancreático ocurre a través del perfeccionamiento potencial progresivo del endodermo como resultado de las interacciones con los tejidos vecinos.

El endodermo dorsal dará lugar a la yema pancreática dorsal, y el endodermo ventral dará lugar al páncreas ventral (Kim *et al.*, 1997; Lammert *et al.*, 2001). Cada yema pancreática recibe distintas señales de los tejidos que las rodean. Varios estudios tienen identificados algunos sistemas de señalización morfogénica, que incluyen FGF, TGFβ, VEGF, ácido retinoico, ligando sonic hedgehog, que están involucrados en el modelamiento del endodermo pancreático (Wells y Melton, 2000).

Por ejemplo alrededor del día embrionario 9-10 del ratón, las yemas epiteliales invaden alrededor del mesénquima circundante para posteriormente llevarse a cabo la morfogénesis de las ramificaciones. Estudios recientes han mostrado que los progenitores pluripotentes que van a dar lugar a todos los tipos celulares pancreáticos están localizados en las puntas de las redes de las ramificaciones (Zhou *et al.*, 2007). Sin embargo, algunas células endocrinas aparecen en este estado de desarrollo, mayormente células positivas a glucagón; la mayoría de células que expresan hormonas comienzan a aparecer alrededor de los 13-14 días, periodo conocido como segunda transición.

En este tiempo, el tubo digestivo gira para que las dos yemas se aproximen. A medida que avanza la embriogénesis, el órgano se diferencia y crece mientras que los grupos de células que producen enzimas digestivas que desembocan en células ductuales se

organizan y las células endocrinas se organizan en grupos de islotes (Jorgensen *et al.*, 2007).

2.4.1) Control transcripcional en el desarrollo del páncreas

La diferenciación celular se logra con la iniciación y mantenimiento de un buen control de patrones de expresión genética que es llevada a cabo por los factores de transcripción, espaciales y específicos. La disfunción en los reguladores de transcripción de las células β podría dar lugar a la diabetes. La alteración de genes específicos en ratón nos ha dado enorme información acerca del rol que los factores de transcripción juegan durante el desarrollo del páncreas y la función de las células β (Olek, 2006).

2.4.2) Reguladores de los progenitores de células endocrinas pancreáticas

2.4.2.1) Pdx1

Entre los primeros factores de transcripción expresado está el homeobox pancreático duodenal 1 (Pdx1) (Guz *et al.*, 1995; Offield *et al.*, 1996). Pdx1 es principalmente encontrado en células productoras de insulina (Guz *et al.*, 1995; Leonard *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1994; Offield *et al.*, 1996). La pérdida de la función de Pdx1 puede resultar en una agenesia pancreática (Stoffers *et al.*, 1999).

Holland *et al.* (2002) mostraron que la función de Pdx1 es también requerida en la mitad de la gestación para la diferenciación de ambas células, del islote y las del acino. En estadíos adultos, Pdx1 juega un rol importante en la función de las células β , incluyendo la regulación de la expresión de la insulina como lo demuestra los defectos en la homeostasis de la glucosa en ratones heterocigotos Pdx1 (Brissova *et al.*, 2002). Además, la inactivación específica de Pdx1 en las células β en ratón da lugar a diabetes. (Ahlgreen *et al.*, 1998). La

red transcripcional vinculada con Pdx1 ha sido extensamente estudiada en la última década (Zaret, 2008). Análisis de secuencias Pdx1 reveló tres áreas altamente conservadas. El transgen β -galactosidasa reportado contiene las regiones I a III conservadas resumiendo la expresión del desarrollo del Pdx1 endógeno (Gannon *et al.*, 2001). Estas regiones contienen sitios de unión para factores de transcripción conocidos, como son Foxa2, HNF6, Pdx1, Ptf1a y MafA (Miyatsuka *et al.*, 2007; Vanhoose *et al.*, 2008; Wiebe *et al.*, 2007), indicando que ellos pueden ser los reguladores directos de Pdx1.

Algunos otros factores de transcripción están involucrados en la regulación selectiva de Pdx1 en el páncreas dorsal o ventral. Así, por ejemplo, ratones carentes de homeobox H1xb9 presentan agenesia selectiva del páncreas dorsal (Harrison *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999). Similarmente, el factor de transcripción Hex ha mostrado que se le es requerido para el apropiado desarrollo del páncreas ventral (Bort *et al.*, 2004). Estas observaciones refuerzan la idea que las yemas dorsal y ventral están gobernadas por factores de transcripción en combinaciones diferentes y que la expresión de Pdx1 puede depender de varios conjuntos de señales para cada yema pancreática.

2.4.2.2) Ptf1a/p48

Otro factor importante de transcripción expresado en los progenitores pancreáticos es el Ptf1a/p48 basic helix-loop-helix (bHLH). Ptf1a/p48 es detectado a través del epitelio pancreático y se restringe a la célula acinar (Krapp *et al.*, 1998). Originalmente se pensaba que Ptf1a/p48 se requería exclusivamente para el páncreas exocrino, dada su restringida expresión en etapas posteriores en el desarrollo del páncreas y la ausencia de páncreas exocrino cuando Ptf1a/p48 es inactivado en ratones (Krapp *et al.*, 1998). Sin

embargo, experimentos más recientes de seguimiento de linaje revelaron que Ptf1a/p48 se expresa en todos los progenitores del páncreas que dan lugar a las células endocrinas, exocrinas y ductuales (Kawaguchi *et al.*, 2002). Así, Ptf1a/p48 es importante para la especificación de los primeros progenitores pancreáticos y como fue mencionado antes, en la regulación de la expresión de Pdx1.

2.4.2.3) Ngn3

El más importante factor de transcripción que ha sido identificado como específico para el desarrollo endocrino es el factor de transcripción Neurogenina 3 (Ngn3). La expresión de Ngn3 se observó por primera vez en los días 8-9 en el ratón, y el pico de la expresión cerca de los días 14-15, una etapa que corresponde a la ola de diferenciación endocrina (Schwitzgebel *et al.*, 2000).

En el páncreas adulto, la expresión de Ngn3 es casi indetectable. Los experimentos, muestra que las células que expresan Ngn3 funcionan como células precursoras endocrinas, y dan lugar a todas las células pancreáticas secretoras de hormonas (Gu *et al.*, 2002; Gradwohl *et al.*, 2000). En contraste, la sobreexpresión de Ngn3 en los progenitores pancreáticos conduce a una diferenciación endocrina prematura (Apelqvist *et al.*, 1999).

2.4.2.4) Pax/Arx

En el embrión del ratón, Pax4 y Arx son expresados en el desarrollo del páncreas. A medida que avanza el desarrollo, el patrón de expresión de estos dos factores de transcripción se excluye mutuamente, especialmente en las últimas etapas. Pax4 es restringido para células β y D, mientras que Arx es expresado en células α y E (Sosa-Pineda, 2004).

Después del nacimiento, la expresión de Pax está casi completamente ausente en las células B y la expresión de Arx persiste en las células A maduras. La inactivación de Pax4 en ratones conduce a la formación de islotes con células A y E exclusivamente y falta de células B y D. En estos ratones, la expresión de Arx está sobre regulada (Sosa-Pineda *et al.*, 1997).

2.4.2.5) Factores de transcripción Nkx

Tres miembros de la familia de las proteínas Nkx son expresadas en el desarrollo del páncreas, Nkx2.2, Nkx6.1 y Nkx6.2 y están involucradas en la diferenciación del linaje endocrino. Ratones deficientes de Nkx2.2 muestran número reducido de células α y PP y una completa ausencia de células β (Sussel *et al.*, 1998). Eso demuestra que en ausencia de Nkx2.2, las células β inician su especificación pero no son capaces de diferenciarse completamente en células maduras productoras de insulina. Este fenotipo puede ser debido a la baja regulación de Nkx6.1, la cual es requerida en los últimos estadios del desarrollo endocrino desde que el fenotipo de los ratones que les falta características de Nkx6.1 una selectiva reducción de celular β con un complemento normal de otros tipos celulares endocrinos. La expresión de Nkx2.2 en los ratones Nkx6.1 knockout no están afectados (Sander *et al.*, 2000).

El patrón de expresión de Nkx6.1 es similar que el de Nkx2.2. es ampliamente expresado hasta los días 10-11 pero es expresado exclusivamente en células β al final de la gestación. Ratones sin Nkx2.2 no expresan Nkx6 (Sussel *et al.*, 1998). Una comparación de individuales y dobles de ratones mutantes knockout demuestra la jerarquía y la relación epistática entre Nkx2.2 y Nkx6.1. así, ratones con mutaciones homocigotas en ambos

Nkx6.1 y Nkx2.2 son idénticos a esos ratones mutantes con homocigosis simple Nkx2.2 (Sander *et al.*, 2000).

2.4.3) Factores involucrados en la maduración de las células endocrinas pancreáticas

Una vez las células están dentro del islote son diferenciadas en células que expresan hormonas, cada una de estas diferentes células endocrinas tienen que mantener esta identidad. Esto se logra por la constante expresión de factores de transcripción necesarios para la maduración y la expansión de cada tipo de células. Un regulador general de la expansión y organización de todas las células endocrinas dentro del islote es el gen Pax6 (Ashery-Padan *et al.*, 2004).

2.4.3.1) NeuroD/BETA2

Es expresado desde los días 8-9 en el embrión en células pancreáticas dispersas y desde los días 13-14 de embrión es expresado en células Ngn3+. Después del nacimiento, esta expresión comienza a restringirse por las células β maduras. Su inactivación en ratones conduce a una disminución en número de células en el islote, especialmente en las células β sometiéndose a apoptosis (Naya *et al.*, 1997). NeuroD/BETA2 es un fuerte inductor de insulina para la unión directa con el E-box presente en el promotor de insulina y regular su propia transcripción.

2.4.3.2) MafA

La leucina básica de cierre MafA es un factor de transcripción específico de células β que se une al bien caracterizado promotor insulínico (Kataoka *et al.*, 2002; Matsuoka *et al.*, 2003). La expresión de MafA comienza en los días 13-14 del embrión en las primeras

células productoras de insulina, y su expresión continua en las células β madura (Matsuoka *et al.*, 2003). La inactivación de MafA en el embrión del ratón no perturba el desarrollo de las células β , pero el recién nacido se convierte en intolerante a la glucosa como una consecuencia de la disminución de la masa de células β y apoptosis de células β (Zhang *et al.*, 2005).

El MafA no es requerido para el desarrollo del páncreas embrionario pero es crucial para el mantenimiento de células β funcionales (Sosa-Pineda, 2004). MafA interactúa con Pdx1 y NeuroD para activar la transcripción de la insulina (Aramata *et al.*, 2005).

2.4.3.3) Pdx1

Pdx1 es también un regulador clave de la diferenciación celular. Como se mencionó Pdx1 está restringido para las células β en las etapas tardías del desarrollo del páncreas y persisten en la vida adulta. Su actividad es requerida para la activación de muchos genes de la célula β , incluyendo GLUT2 y glucoquinasa (Kataoka *et al.*, 2002; Matsuoka *et al.*, 2003). Pdx1 y MafA regulan la transcripción (Raum *et al.*, 2006; Samaras *et al.*, 2003) por retroalimentación que contribuye a reforzar la red regulatoria que mantiene la identidad de las células β mediante la activación del promotor de la insulina (Aramata *et al.*, 2005).

2.5) Neogénesis de células β

Durante la vida fetal, cerca de un 80% del total de células que se generan lo hacen mediante diferenciación de células endoteliales. Después del nacimiento, se ha postulado que la replicación es el principal medio de expansión de las células β diferenciadas (Sweene, 1992) y en la vida adulta ellas están altamente diferenciadas. A pesar de ello, en

el adulto el epitelio de los conductos pancreáticos puede ser estimulado para inducir neogénesis.

Un incremento en la tasa de neogénesis se ha conseguido en varios modelos experimentales (Terazono *et al.*, 1988; Wang, 1995). Sin embargo, estos modelos no son adecuados para la correcta evaluación de factores específicos involucrados en la regeneración de las células β .

2.5.1) Replicación de células β

Respecto al mecanismo de replicación, algunos autores piensan que es el principal medio de expansión después del nacimiento, pero con una capacidad que disminuye con la edad (Sweene, 1992). Como los islotes adultos muestran muy pocas células mitóticas y muy bajos índices de incorporación de análogos de timidina (BrdU), comúnmente se han considerado que no son capaces de crecer. Sin embargo, en algunos modelos *in vitro* e *in vivo* con islotes de ratones neonatos y adultos se ha demostrado lo contrario, encontrándose que unos y otros responden de manera similar a la mayoría de los estímulos.

Aunque puede haber numerosos estímulos para el crecimiento de células β , se conocen tres estímulos importantes: prolactina, la hormona de crecimiento y la glucosa. La glucosa es un estímulo *in vivo* e *in vitro*. Ya en 1938, Woerner informó de un aumento en el tejido del islote en conejillos de Indias después de infusiones de glucosa continua. Desde entonces, ese aumento ha sido confirmado por otros estudios (Bonner-Weir *et al.*, 1989; Logothetopoulos y Valiquette, 1984). La glucosa ha demostrado estimular un modesto crecimiento en cultivos de células β pancreáticas de neonatales y adultos (Nielsen, 1985). El embarazo ha demostrado causar un aumento en la replicación y mayor masa de células β

(Sorenson y Parsons, 1985). Como un hallazgo paralelo, en estudios *in vitro* han demostrado que la prolactina, lactógeno placentario y hormona de crecimiento pueden estimular la replicación de células β (Brelje y Sorenson, 1991).

Un estímulo neuronal ha sugerido el aumento de la masa del islote después de una lesión del hipotálamo ventromedial (Jeanrenaud, 1985). Los posibles efectos de las incretinas en la masa del islote se han sugerido por estudios *in vivo* utilizando un agonista prolongado de GLP-1, exendin 4, en ratas normales. Exendin 4 había estimulado replicación β -celular, así como la neogénesis (Xu *et al.*, 1999). Además de estos conocidos estímulos, una compleja orquestación de, aún no identificados factores deben participar.

Como un medio de identificar algunos de estos factores peptídicos de crecimiento han sido estudiados en cultivos del islote. El factor más comúnmente probado ha sido IGF-, pero los resultados han variado (Nielsen, 1985; Brelje y Sorenson, 1991) de IGF puede funcionar más como un factor de supervivencia de las células del islote (Petrik *et al.*, 1998). Ninguno de los factores estudiados hasta el momento han producido marcada estimulación de replicación *in vitro*, pero la importancia de su contribución al crecimiento y desarrollo aún no se actualiza. La coordinación de múltiples factores de crecimiento del islote promete ser sumamente compleja.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1) Lugar de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el matadero Municipal Ninacaca de la Región Pasco-Perú, por la factibilidad de la adquisición de los animales, a 4140 metros sobre el nivel del mar, único camal de camélidos de la región. En este lugar se tomaron las muestras de las alpacas hembras y sus respectivos fetos.

El procesamiento histológico, la bioquímica sanguínea de las muestras y la lectura de los resultados se realizaron en el Laboratorio de Farmacología y Toxicología Veterinaria y en el IVITA-Mantaro de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y en el Departamento de Sanidad Animal-Laboratorio de Patología Animal del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), en el Departamento de Lima.

3.2) Animales y muestras

En el presente estudio se han utilizaron 18 fetos de alpaca y sus respectivas madres clínicamente sanas de 3-5 años de edad, provenientes del matadero Municipal Ninacaca de la Región Pasco-Perú. Los animales fueron agrupados en 3 tercios de gestación: 3 fetos (F1) y 3 madres (M1) en el primer tercio, 4 fetos (F2) y 4 madres (M2) en el segundo tercio, y 11 fetos (F3) y 11 madres (M3) en el tercer tercio. La edad gestacional en los fetos en estudio, fue determinada utilizando como referencia las medidas biométricas fetales, las cuales siguen un patrón de desarrollo constante durante la etapa fetal, y así poder determinar la edad gestacional del feto de alpaca. Las referencias anteriores consideradas

fueron utilizadas por Gazitua *et al.* (2001), quienes determinaron la edad fetal en función del diámetro biparietal medido a través de un caliper Pretul de 5'' (Fig. 1).



Figura 1. Determinación de la edad gestacional de fetos de alpaca a través de la medida del diámetro biparietal usando un Vernier. $EDAD\ GESTACIONAL = (BPD - 0.11376) 47.23287$, $r = 0.98$, $P < 0.001$ (r : Coeficiente de regresión; P : Significancia). Ej: Feto 3, BPD= 7, EDAD DIAS = 325.25, Edad en meses= 10.84

La sangre se obtuvo por punción intracardíaca (fetos) y de la vena yugular (madres, ante-mortem) y fueron colocadas en tubos de ensayo sin anticoagulante para venipunción, inmediatamente se centrifugaron las muestras a 3000 rpm por 15 minutos, en una centrifuga automática (GEMMY, Taiwan), el suero se almacenó a -196°C en tanque de nitrógeno líquido (GEMMY, Taiwan) para su posterior análisis.

Las muestras de páncreas fetal diseccionadas se seccionaron en porciones 1,5-2 cm², los que se conservaron en frascos plásticos que contenían formol bufferado al 15%, y posteriormente fueron embebidos en parafina.

3.3) Materiales

3.3.1) Equipos y materiales para el procesamiento y análisis bioquímico colorimétrico.

3.3.1.1) Reactivos y materiales

- Kit de Glucosa Enzimática Líquida (FAR Diagnostics, Italia).
- Alcohol 96°.
- Nitrógeno líquido (-196°C).
- Agua destilada con un pH de 7.1.
- Suero fisiológico.

3.3.1.2) Equipos de laboratorio

- Analizador Bioquímico Semiautomático (SINNOWA, China).
- Estufa.
- Centrífuga.
- Tanque de nitrógeno líquido.
- Micropipetas con capacidad de 100 – 1000 ul y de 5-50 ul.
- Cronómetro
- Refrigeradora.
- Tips.

3.3.2) Equipos y materiales para el procesamiento y estudio histológico

3.3.2.1) Reactivos y materiales

- Formol bufferado al 15%.
- Tinción de HE (Servicio realizado por el SENASA, Lima).
- Material de disección.
- Láminas cubreobjetos y portaobjetos.
- Frascos plásticos de 100 ml.
- Algodón.
- Gasa.

3.3.2.2) Equipos de laboratorio

- Microscopio trinocular con luz incorporada (Carl Zeiss, Alemania).
- Software de medición ZEN 2012 SP1 (Blue edition, Carl Zeiss, Alemania).
- Cámara digital AxionCam ERc5s (Carl Zeiss, Alemania).

3.4) Metodología

3.4.1) Animales y muestras

En el presente estudio se utilizaron 18 alpacas de 3 - 5 años de edad clínicamente sanas, para lo cual se evaluó el comportamiento, condición y peso corporal, constantes fisiológicas, examen físico y signos e historias clínicas, provenientes del matadero Municipal de Ninacaca en la Provincia de Pasco. La sangre fue obtenida mediante punción de la vena yugular (5 ml) ante-mortem teniendo en cuenta los lineamientos de bienestar animal (GECS, 2012). La sangre

fue colocada en tubos sin anticoagulante para venopunción, inmediatamente se centrifugaron las muestras a 3000 rpm por 15 minutos, en una centrifuga automática (GEMMY, Taiwán) para la separación del suero, el que se almacenó a -196°C en tanque de nitrógeno líquido (GEMMY, Taiwán) para su posterior procesamiento (Díaz *et al*, 2015).

3.4.1.1) Toma de muestra para el estudio Histológico

Las muestras fueron reducidas a tres piezas por muestra (parte media y cola del páncreas) con ayuda de hojas de afeitar a un tamaño aproximado de 0.5x0.5x0.5cm de longitud, las cuales fueron colocadas en cápsulas debidamente identificadas y se procedió al lavado con agua corriente durante 6 horas, luego fueron colocados en el equipo de procesamiento de muestras.

Las muestras se conservaron en frascos plásticos que contenían formol bufferado al 15%, el cual tiene la propiedad de además de mantener estable la estructura de los tejidos, conserva mejor sus determinantes bioquímicos y propiedades antigénicas de superficie celular (Santana *et al.*, 2003).

Estas muestras se remitieron al Laboratorio de Patología del SENASA para su posterior procesamiento histopatológico, siguiendo los pasos:

- Reducción y Lavado
- Deshidratación y parafinado
- Inclusión en parafina

- Corte de las muestras en el micrótopo a un grosor aproximado de 7 – 10 micras
- Tinción de Hematoxilina - Eosina.

3.5) Procedimiento

3.5.1) Determinación de Glucosa

La glucosa oxidasa (GOD) oxida a la glucosa en ácido glucónico y forma el peróxido hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD) el peróxido hidrógeno reacciona con el fenol y 4-aminofenazona y produce un complejo coloreado, cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra (Kaplan, 1984).

3.5.1.1) Muestras

Se utilizó suero sanguíneo. Evitando obtener muestras hemolizadas. Se separó tan pronto fue posible las células de la sangre en cuanto la glicólisis consume la glucosa (aproximadamente 5% por hora) y proporciona falsamente valores disminuidos (FAR DIAGNOSTICS, Italia).

Condiciones de reacción

Se utilizó en método Punto final en incremento, teniendo en cuenta las siguientes condiciones:

- Longitud de Onda: 510 nm.
- Temperatura de reacción: 37°C.
- Tiempo de reacción: 5 – 10 minutos.
- Volúmenes de muestra y reactivos: 10 µl muestra + 1 ml de reactivo 1.

Procedimiento: De acuerdo al manual del Kit Glucosa Líquida Método Trinder – Punto Final (FAR DIAGNOSTICS, Italia).

3.5.2) Análisis de medición histológica

Las muestras de páncreas en parafina fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina (HE). Los Islotes de Langerhans (IL) se observaron por microscopia óptica (Carl Zeiss, Alemania), y mediante una cámara digital incorporada AxionCam ERc5s (Carl Zeiss, Alemania) se obtuvieron fotografías a 10X y se determinó número de IL/mm² de páncreas (N°IL/mm²) y el diámetro de los IL (μm) con el Software de medición ZEN 2012 SP1 (Blue edition, Carl Zeiss, Alemania) (Rodríguez *et al.*, 2015, Rodríguez *et al.*, 2012).

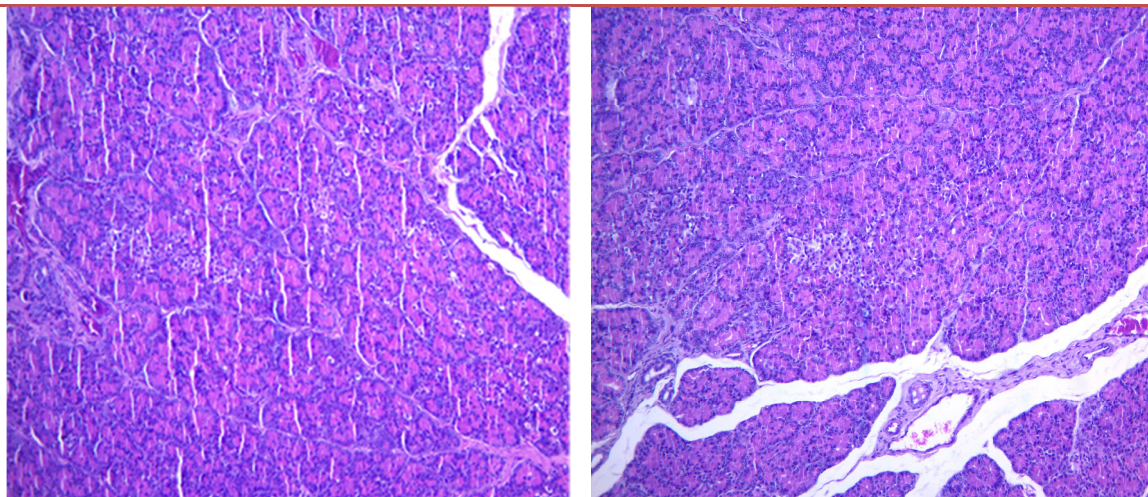


Figura 2. Medicion de islotes de Langerhans

3.6) Análisis de datos

Se evaluó la existencia de diferencias estadísticas significativas ($p < 0.001$) entre los tres grupos (tercios de gestación) de los niveles de glucosa materno-fetal, $N^{\circ}IL/mm^2$ y el diámetro de los IL en pancreas fetal, dichos valores se expresan como Promedios (Prom) \pm Desviación estándar (DE), y fueron analizados con el software Graphpad Prism versión 6.0, por ANOVA y la prueba post hoc de Duncan con un nivel de significancia del 99,9%. Mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson se intentó determinar la posible influencia de los niveles de glucosa maternal (X) sobre los valores fetales (Y) de glucosa, $N^{\circ}IL/mm^2$ en pancreas fetal y el diámetro de los IL pancreáticos fetales.

IV. RESULTADOS

Análisis histológico

El diámetro de los IL (μm) (Prom \pm DE).de páncreas fetal de acuerdo al tercio de gestación se muestran en la figura 2: F1, 1.18 ± 0.01 ; F2, 1.36 ± 0.11 ; F3, 1.56 ± 0.08 .

El N°IL/mm² (Prom \pm DE).fetal de acuerdo al tercio de gestación se presentan en la figura 3: F1, 2.36 ± 0.04 ; F2, 4.85 ± 0.58 ; F3, 7.28 ± 1.38 .

Bioquímica Sanguínea

Los niveles de glucosa sanguínea (mg/dl) (Prom \pm DE) de acuerdo al tercio de gestación se presentan en la figura 4: F1, 208 ± 3.5 ; M1, 126.5 ± 2.2 ; F2, 229 ± 14.6 ; M2, 126.5 ± 9.5 ; F3, 266 ± 16.2 ; M3, 163.2 ± 12.3 .

La correlación que existe entre los promedios de: los niveles de glucosa maternal y los niveles de glucosa fetal, N°IL/mm² fetal y el diámetro de los IL fetal, indicaría una influencia fuerte de la glucosa maternal en el desarrollo del páncreas endocrino fetal.

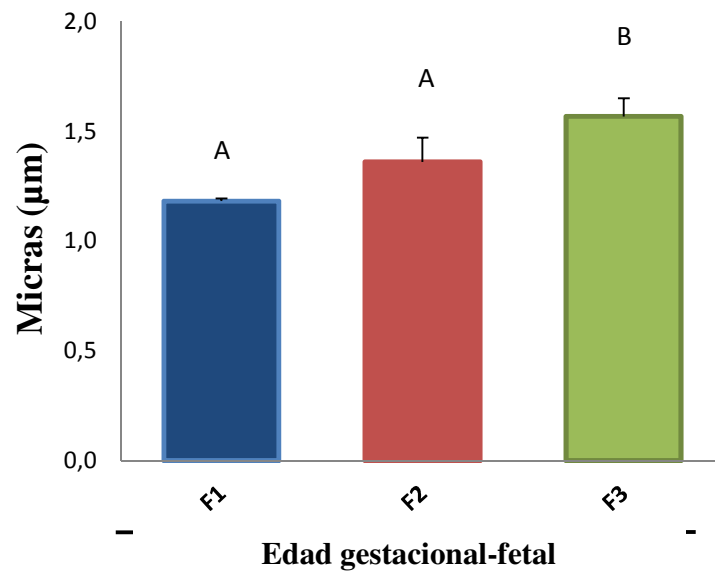


Fig 3. Diámetro de los IL en fetos de alpacas agrupados en 3 tercios de gestación. Letras distintas denotan diferencias significativas evaluadas por ANOVA-Duncan post hoc test ($p<0.001$).

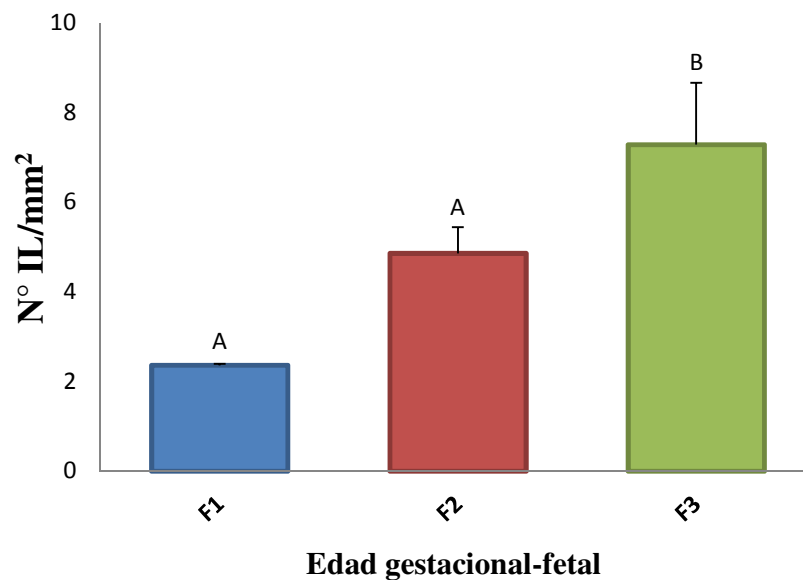


Fig 4. N° IL/mm² en fetos de alpacas agrupados en 3 tercios de gestación. Letras distintas denotan diferencias significativas evaluadas por ANOVA-Duncan post hoc test ($p<0.001$).

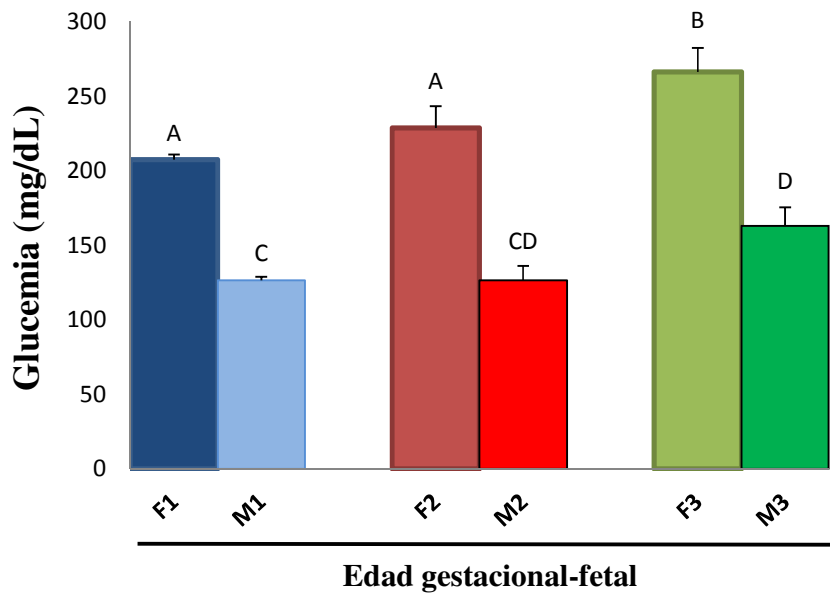


Fig 5. Glucemia fetal y materna agrupados en 3 tercios de gestación. Letras distintas denotan diferencias significativas evaluadas por ANOVA-Duncan post hoc test ($p < 0.001$).

Cuadro 1. Coeficiente de Correlación entre glucosa materna y los niveles de glucosa fetal, N°IL/mm² fetal y el diámetro de los IL fetal

	Glucosa fetal	N°IL/mm ²	diámetro de los IL
Glucosa Maternal	0.98	0.99	0.93

V. DISCUSIÓN

La glucosa es la principal fuente energética del organismo y su homeostasis se debe principalmente al correcto funcionamiento del páncreas endocrino, a través de sus secreciones hormonales como son la insulina y el glucagón. Alteraciones en este sistema endocrino causarán trastornos metabólicos hipo o hiperglucémicos (DeFronzo, 1997).

Hemos observado que hay una correlación fuerte entre la glucemia maternal y la fetal (Cuadro 1), y que ésta aumenta significativamente ($p < 0.001$) en el último tercio de gestación (Fig 5). En mamíferos, se ha observado esta correlación donde a mayor velocidad neta de captación y niveles sanguíneos de glucosa maternal, se incrementará el paso a placenta y por ende al feto (Kulhanek *et al.*, 1974). En el feto de oveja, la utilización de glucosa depende de manera directa de las concentraciones materna y fetal de glucosa así como de la concentración de insulina en el feto (Wilkening y Meschia, 1983). Así, durante la hipoglucemia maternal inducida por el ayuno existe una caída en la captación umbilical de glucosa y de la utilización de glucosa por el feto.

Los patrones de desarrollo pancreático en nuestro estudio son muy similares a los hallados en otras especies como las ovejas, siendo los patrones de desarrollo fetal durante la gestación son similares y conservados en los mamíferos, desde los roedores hasta los humanos (Remacle *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2010). Este desarrollo será de vital importancia y continuará durante la etapa postnatal en alpacas (Rodríguez *et al.*, 2015), cobayos (Rodríguez *et al.*, 2012) y otras especies de interés veterinario. Sin embargo, nosotros hemos encontrado algunas diferencias con respecto a los niveles de

glucosa maternal y fetal en borregas donde se determinó sólo en el último tercio de gestación que la glucosa maternal en borregas es menor a la glucosa fetal tanto en individuos obesos y controles (Zhang *et al.*, 2011), a diferencia de nuestro estudio donde hemos determinado que los niveles de glucosa fetal son superiores a la maternal en los tres tercios de gestación (Figura 5). Por otra parte hemos obtenido resultados que nos indicarían que la variación ascendente de la glucemia maternal influye en los crecientes niveles de glucemia fetal y desarrollo pancreático durante la gestación (Figuras 3, 4 y 5). Trabajos en ovejas apoyan dichos hallazgos pues determinaron en el último tercio de gestación que al incrementar o disminuir los niveles glucosa maternal, la glucosa aumentaba o disminuía en los fetos (George *et al.*, 2010; Redmer *et al.*, 2004).

VI. CONCLUSIONES

En nuestro estudio hemos podido determinar la presencia de páncreas endocrino fetal desde el primer tercio de gestación al identificar el número y diámetro de los IL (Fig.3 y Fig.4), siendo estos valores significativos ($p < 0.001$) en el último tercio de gestación, lo que indica que el proceso de diferenciación celular en el páncreas endocrino comienza en la etapa fetal. Este proceso de diferenciación celular se debe principalmente a la proteína PDX1, la cual genera la maduración de las células de los islotes, el desarrollo (Jonsson *et al.*, 1993; Harrison *et al.*, 1999), la diferenciación de las células β (Kojima *et al.*, 2002; Imai *et al.*, 2005), la madurez y función de las células β (Holland *et al.*, 2005).

Los niveles de glucosa fetal-maternal, N° IL/mm² y diámetro de los IL son significativamente ($p < 0.001$) mayores en el último tercio de gestación, lo que indica el mayor desarrollo pancreático fetal en este periodo de la gestación.

Hay una correlación “fuerte” y directa de los valores de glucosa maternal con los valores fetales de glucosa, N° IL/mm² y diámetro de los IL, lo que indica su influencia sobre el desarrollo pancreático.

VII. LITERATURA CITADA

1. **Ahlgreen U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. 1998.** Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipdl1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12: 1763-8.
2. **Aldoretta P, Hay W. 1999.** Effect of glucose supply on ovine uteroplacental glucose metabolism. *Am J Physiol* 277: 947 – 958.
3. **Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, hrabe de Aneglis M, Lendahl U, Edlund H. 1999.** Notch signaling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400: 877-81.
4. **Aramata S, Han S, Yasuda K, Kataoka K. Acta 2005.** Synergistic activation of the insulin gene promoter by the beta-cell enriched transcription factors MafA, Beta2, and Pdx1. *Biochim Biophys* 1730: 41-6.
5. **Ashery-padan R, Zhou X, Marquardt T, Herrera P, Toubé L, Berry A, Gruss P. 2004.** Conditional inactivation of Pax 6 in the pancreas causes early onset of diabetes. *Dev Biol* 269: 479-88.
6. **Baekkeskov S, Aanstoer H, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P. 1990.** Identification of the 64 k autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347: 151-6.
7. **Banting F, Best C. 1922.** The internal secretion. *J LaB Clin Med* 7:465-80.

- 8. Barbacci E, Reber M, Ott M, Breillat C, Huetz F, Cereghini S. 1999.** Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development* 126: 4795-805.
- 9. Bell G, Santere R, Mullenbach G. 1983.** Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagons and two related peptides. *Nature* 302: 716-8.
- 10. Bell, R.M. and Coleman, R.A. 1980.** Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 49: 459-487.
- 11. Bliss M. 1982.** The discovery of insulin University of Chicago Press.
- 12. Bloom SR, Polak JM. 1987.** Somatostatin. *Br Med J.* 295: 288-9.
- 13. Bogin. 2000.** Clinical pathology of Camelides: present and future. *Revue Med Vet* 151 (7): 563- 568 p.
- 14. Bonner-Weir S, Deery D, Leahy J, Weir G. 1989.** Compensatory growth of pancreatic β -cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* 38:49–53.
- 15. Bort R, Martinez-Barbera J, Beddington R, Zaret K. 2004.** Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas. *Development* 131: 797-806.
- 16. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. 1973.** Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-9.
- 17. Brelje T, Sorenson R. 1991.** Role of prolactin versus growth hormone on islet β -cell proliferation in vitro: implications for pregnancy. *Endocrinology* 128:45–57.
- 18. Brenes E, Madrigal K, Pérez F, Valladares K. 2001.** El cluster de los camélidos en el Perú: Diagnóstico competitivo y recomendaciones estratégicas. Proyecto

Andino de Competitividad. Documentos de trabajo. Instituto Centroamericano de Administración de Empresas (INCAE). 71 p.

- 19. Brissova M, Fowler M, Nicholson W, Chu A, Hirshberg B, Harlan D, Powers A. 2005.** Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 53: 1087-97.
- 20. Brissova M, Shiota M, Nicholson W, Gannon M, Knobel S, Piston D, Wright C, Powers A. 2002.** Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 277: 11225-32.
- 21. Burtis C, Ashwood E, Bruns D. 1999.** Tietz Textbook of clinical chemistry. 3rd ed. St. Louis: SAUNDERS Elsevier Inc 1917 p.
- 22. Bustinza V. 2001.** La Alpaca Conocimiento del gran potencial Andino. Oficina de Recursos del Aprendizaje e Innovación- Secciones publicaciones –UNA-Puno. Primera edición 11-24 p.
- 23. Cabrera O, Berman D, Kenyon N, Ricordi C, Berggren P, Caicedo A. 2006.** The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet function. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2334-9
- 24. Cebra C, McKane S, Tornquist S. 2001b.** Effects of exogenous insulin on glucose tolerance in alpacas. *Am J Vet Res* 62 (10): 1544–1547.
- 25. Cebra C, Tornquis S, Van Saun R, Smith B. 2001a.** Glucose tolerance testing in llamas and alpacas. *Am J Vet. Res* 62 (5), 682–686.
- 26. Connors, K. 1980.** Espectroscopía de absorción. En: Curso de análisis farmacéutico (ensayo del medicamento). 2º ed. España: Editorial Reverté S.A 195- 255 p.

- 27. Deconink J, Potvliege P, Gepts W. 1971.** The ultrastructure of the human pancreatic islets I. The islets of adults. *Diabetologia* 7: 266-82.
- 28. DeFronzo R. 1997.** Pathogenesis of type 2 diabetes, metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diab Rev* 5: 177-269.
- 29. Díaz H, Espinoza J, Huanca W, López B, Rodríguez J. 2015.** Características Bioquímicas del Plasma Seminal Fresco y Congelado/Descongelado de Alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 26 (1): 43 -48.
- 30. Eliasson L, Abdulkader F, Braun M, Galvanovski J, Hoppa M, Rorsman P. 2008.** Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *J Physiol* 586: 3313-24.
- 31. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2005.** Situación Actual de los Camélidos Sudamericanos en el Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914.
- 32. Ford S.P, Reynolds L.P, Ferrell C.L. 1984.** Blood flow, steroid secretion and nutrient uptake of the gravid uterus during the periparturient period in sows. *J. Anim Sci* 59: 1085-1091.
- 33. Fowden AL. 2003.** The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta* 24: 803-812.
- 34. Fowden AL, Forhead A.J. 2004.** Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction* 127: 515-526.
- 35. Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. 2006.** Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology Bethesda* 21: 29-37.

- 36. Fowden AL, Li J, Forhead AJ. 1998a.** Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? *Proc Nutr Soc* 57: 113-122.
- 37. Fowler M, Zinkl J. 1989.** Reference ranges for hematologic and serum biochemical values in llamas. *Am J Vet Res* 50 (12) : 2049–2053.
- 38. Gannon M, Gamer L, Wright C. 2001.** Regulatory regions driving development and tissue-specific expression of the essential pancreatic gene *pdx1*. *Dev Biol* 238: 185-201.
- 39. Gazitua FJ, Corradini P, Ferrando G, Raggi LA, Parraguez VH. 2001.** Prediction of gestational age by ultrasonic fetometry in llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Lama pacos*). *Anim Reprod Sci* 66: 81-92.
- 40. George LA, Uthlaut AB, Long NM, Zhang L, Ma Y, Smith DT, Nathanielsz PW, Ford SP. 2010.** Different levels of overnutrition and weight gain during pregnancy have differential effects on fetal growth and organ development. *Reprod Biol Endocrinol* 2010: 8 – 7.
- 41. Gomori G. 1939.** A differential stain for cell types in the pancreatic islets. *Am J Pathol* 15: 497-9.
- 42. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. 2000.** Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1607-11.
- 43. Green A.S, Rozance P.J, Limesand S.W, 2010.** Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. *J Endocrinol* 205: 211–224.

- 44. Grimelius L, Strand A. 1974.** Ultrastructural studies of the argyrophil reaction in alpha1 cells in human pancreatic islets. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 364: 129-35.
- 45. Gu G, Dubauskaite J, Melton D. 2002.** Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129: 2447-57.
- 46. Guz Y, Montminy M, Stein R, Leonard J, Gamer L, Wright C, Teitelman G. 1995.** Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor in β cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* 121: 149-61.
- 47. Harrison K, Thaler J, Pfaff S, Gu H, Kehrl J. 1999.** Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlxb9-deficient mice. *Nat Genet* 23: 71-5.
- 48. Hay WW, Sparks JW, Wilkening RB, Battaglia FC, Meschia G. 1984.** Fetal glucose uptake and utilization as functions of maternal glucose concentration. *Am. J. Physiol* 246(3): 237- 242.
- 49. Hellerström C, Hellman B. 1960.** Some aspects of silver impregnation of the islets of Langerhans in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 35: 518-32.
- 50. Holland A, Gonez L, Naselli G, MacDonald R, Harrison L. 2005.** Conditional expression demonstrates the role of the homeodomain transcription factor Pdx1 in maintenance and regeneration of beta-cells in the adult pancreas. *Diabetes* 54: 2586-2595.

- 51. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn B, Lindner T, Yamagat K, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y, Bell GI. 1997.** Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* 17: 384-5.
- 52. Hutton J, Peshavaria M, Johnston C, Ravazzola M, Orci L. 1988.** Immunolocalization of betagranin: a chromogranin A-related protein of the pancreatic B-cell. *Endocrinology* 122: 1014-20.
- 53. Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Uno K, Hasegawa Y. 2005.** Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 402-409.
- 54. Jeanrenaud B. 1985.** An hypothesis on the aetiology of obesity: dysfunction of the central nervous system as a primary cause. *Diabetologia* 28:502–513.
- 55. Johnson K, Brien T, Hayden D, Jordan K, Ghobrial H, Mahoney W, Westermark P. 1988.** Immunolocalization of islet amyloid polypeptide (IAPP) in pancreatic beta cells by means of peroxidase-antiperoxidase (PAP) and protein A-gold techniques. *Am J Pathol* 130: 1-8.
- 56. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. 1993.** Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 37: 606-609.
- 57. Jorgesen M, Ahnfelt-Ronne J, Hald J, Madsen O, Serup P, Hecksher-Sorensen J. 2007.** An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev* 28: 685-705.
- 58. Kaneko J. 1989.** *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Fourth ed. Academic Press, San Diego 932 p.

- 59. Kaplan LA. 1984.** Glucose. Kaplan A. Clinical Chemistry. Princeton: The CV Mosby Co, St Louis Toronto 1032-1036 p.
- 60. Kataoka K, Han S, Shioda S, Hirai M, Nishizawa M, Handa H. 2002.** MafA is a glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. J Biol Chem 277: 49903-10.
- 61. Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald R, Wright C. 2002.** The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. Nat Genet 32: 128-34.
- 62. Kennaugh JM, Hay WW. 1987.** Nutrition of the fetus and newborn. West J. Med 147: 435-448.
- 63. Kim S, Hebrok M, Melton D. 1997.** Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. Development 124: 4243-52.
- 64. Kimmel J, Pollock H, Hazelwood R. 1971.** A new pancreatic polypeptide. Fed Proc (USA) 30: 1318.
- 65. Klimstra D, Hruban R, Pitman M. 2007.** In: Histology for Pathologists, 3rd ed. Stacey E Mills, editor. Lippincott, Williams & Wilkins.
- 66. Kojima H, Nakamura T, Fujita Y, Kishi A, Fujimiya M, Yamada S, Kudo M. 2002.** Combined expression of pancreatic duodenal homeobox 1 and islet factor 1 induces immature enterocytes to produce insulin. Diabetes 51: 1398-1408.
- 67. Krapp A, Knofler M, Lederman B, Burki K, Berney C, Zoerkler N, Hagenbuchle O, Wellauer P. 1998.** The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. Genes Dev 12: 3752-3763.

- 68. Lammert E, Cleaver O, Melton D. 2001.** Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 294: 564-7.
- 69. Lan M, Wasserfall C, Maclaren N, Notkins L. 1996.** IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 93: 6367-70.
- 70. Lane M. 1907.** The cytological characteristics of the areas of Langerhans. *Am J. Anat* 409-422.
- 71. Larsson L, Sundler F, Hakansson R, Pollock H, Kimmel J. 1974.** Localization of APP, a postulated new hormone to a pancreatic endocrine cell type. *Histochemistry* 42: 377-82.
- 72. Lassen E, Pearson E, Long P, Schmotzer W, Kaneps A, Riebold T, 1986.** Clinical biochemical values of llamas: reference values. *Am. J. Vet. Res.* 47 (10), 2278–2280.
- 73. Lee C, Smith S, Watada H, Lin J, Scheel D, Wang J, Mirmira R, German M. 2001.** Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes*. 50: 928-36.
- 74. Lee H, Wang G, Englander E, Kojima M, Greeley Jr G. 2002.** Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 143:185– 190
- 75. Leonard J, Peers B, Johnson T, Ferreri K, Lee S, Montminy M. 1993.** Characterization of Somatostatin Transactivating Factor-1, a Novel Homeobox

Factor That Simulates Somatostatin Expression in Pancreatic Islet Cells. *Molecular Endocrinology* 7: 1275-83.

- 76. Leturque A, Ferre P, Burnol AF, Kande J, Maulard P, Girard J. 1986.** Glucose utilization rates and insulin sensitivity in vivo in tissues of virgin and pregnant rats. *Diabetes* 35: 172-177.
- 77. Li H, Arber S, Jessell T, Edlund H. 1999.** Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9. *Nat Genet* 23: 67-70.
- 78. Liechty E.A, Lemons JA. 1984.** Changes in ovine fetal hindlimb amino acid metabolism during maternal fasting. *Am. J. Physiol* 246: E430-E435.
- 79. Logothetopoulos J, Valiquette N. 1984.** Hormonal and non-hormonal protein biosynthesis in the pancreatic beta cell of the intact rat after prolonged hyperglycemia. *Acta Endocrinol (Copenh)* 107:382–389.
- 80. Maestro M, Boj S, Luco R, Pierreux C, Cabedo J, Dervitija J, German M, Rousseau G, Lemaigre F, Ferrer J. 2003.** Hnf6 and Tcf2 (MODY5) are linked in a gene network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas. *Hum Mol Genet* 12: 33007-14.
- 81. Malecki M, Yang Y, Antonellis A, Curtis S, Warram J, Krolewski A. 1999.** Identification of new mutations in the hepatocyte nuclear factor 4alpha gene among families with early onset Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 16: 193-200.
- 82. Matsuoka TA, Zhao L, Artner I, Jarret H, Friedman D, Means A, Stein R. 2003.** Members of the large Maf transcription family regulate insulin gene transcription in islet beta cells. *Mol Cell Biol* 23: 6049-62.

- 83. Meier J, Butler A, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, Rizza R, Butler P. 2008.** Beta cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta cell mass in humans. *Diabetes* 57: 1584-94.
- 84. Miller C, McGhee R, Habener J. 1994.** IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *EMBO J* 13: 1145-56.
- 85. Miyatsuka T, Matsuoka T, Shiraiwa T, Yamamoto T, Kojima I, Kaneto H. 2007.** Ptf1a and RBP-J cooperate in activating Pdx1 gene expression through binding to Area III. *Biochem Biophys Res Commun* 362: 905-9.
- 86. Naya F, Huang H, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo F, Leiter A, Tsai MJ. 1997.** Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11: 2323-34.
- 87. Nielsen J. 1985.** Growth and function of the pancreatic β cell in vitro: effects of glucose, hormones and serum factors on mouse, rat and human pancreatic islets in organ culture. *Acta Endocrinol Copenh* 108(suppl. 266):1.
- 88. Novoa C, Flores A. 1991.** Producción de rumiantes menores: Alpacas. RESUMEN, Lima, Perú 359p.
- 89. Offield M, Jetton T, Labosky P, Ray M, Stein R, Magnuson M, Hogan B, Wright C. 1996.** PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122: 983-95.
- 90. Olek K. 2006.** Maturity-onset diabetes of the young: an update. *Clin Lab* 52: 593-8.

- 91. Olofsson C, Göpel S, Barg S, Galvanovskis J, Ma X, Salehi A, Rorsman P, Eliasson L. 2002.** Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic beta cells. *Pflügers Arch.* 444: 43-51.
- 92. Orci L, Baetens D, Ravazzola M, Stefan Y, Malaisse-Lagae F. 1976.** Pancreatic polypeptide and glucagon: non-random distribution in pancreatic islets. *Life Sci.* 19: 1811-5.
- 93. Orci L. 1986.** The insulin cell: its cellular environment and how it processes (pro) insulin. *Diabetes Metab Rev.* 2:71-106
- 94. Petrik J, Arany E, McDonald T, Hill D. 1998.** Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor. *Endocrinology* 139:2994–3004.
- 95. Quispe E, Rodríguez T, Iñiguez L, Mueller J. 2009.** Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Resources Information* 45: 1–14.
- 96. Rahier J, Goebbels R, Henquin J. 1983.** Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia* 24: 366-71.
- 97. Rahier J, Guiot Y, Goebbels R, Sempoux C, Henquin J. 2008.** Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 10 (4): 32-42.
- 98. Raum J, Gerrish K, Artner I, Henderson E, Guo M, Sussel L, Schisler J, Newgard C, Stein R. 2006.** FoxA2, Nkx2.2 and PDX-1 regulate islet beta-cell-specific mafA expression through conserved sequences located between bae pairs -

8118 and -7750 upstream from the transcription start site. *Mol Cell Biol* 26: 5735-43.

- 99. Redmer DA, Wallace JM, Reynolds LP. 2004.** Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. *Domest. Anim. Endocrinol* 27:199–217
- 100. Remacle C, Dumortier O, Bol V, Goosse K, Romanus P, Theys N, Bouckennooghe T, Reusens B, 2007.** Intrauterine programming of the endocrine pancreas. *Diabetes Obes. Metab* 9 (Suppl. 2): 196–209.
- 101. Rodríguez J, Cueva S, Vásquez M, Lira B, Olivera L, Espinoza J. 2012.** Desarrollo postnatal del páncreas endocrino de cuyes (*Cavia porcellus*) lactantes. *Rev Inv Vet Perú* 23 (1): 13 – 19.
- 102. Rodríguez J, Espinoza J, Rojas G, Lira B, Vásquez M, López-Torres B, Caro C. 2015.** Desarrollo de los Islotes de Langerhans en páncreas de crías de alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 26(3): 381-388.
- 103. Saito K, Takahashi T, Yagginuma B, Iwama N. 1978.** Morphometrical analysis on topographical difference in size distribution, number and volume of islets in the human pancreas. *Tohoku J ex Med* 124: 177-86.
- 104. Samaras S, Zhao L, Means A, Henderson E, Matsuoka T, Stein R. 2003.** The islet beta cell-enriched RIPE3b1/Maf transcription factor regulates pdx-1 expression. *J Biol Chem* 278: 12263-70.
- 105. Sander M, Sussel L, Connors J, Scheel D, Kalamaras J, De la Cruz F, Schwitsgebel V, Hayes-Jordan A, German M. 2000.** Homeobox gene Nkx6.1 lies

downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. Development 127: 533-40.

106. Santana VL, Alves LC, Souto – Maior MP, Faustino MA, De Lima MM. 2003.

Ocorrência de Sarcocystis (Lankester, 1882) na musculatura cardíaca de bovinos comercializados em feiras livres do município de São Lourenço da Mata – Pernambuco – Brasil. R Bras Ci Vet 10 (1): 39 – 41 p.

107. Schwitzgebel V, Scheel D, Connors J, Kalamaras J, Lee J, Anderson D, Sussel

L, Johnson J, German M. 2000. Expression of neurogenin3 reveals an inslet cell precursor population in the pancreas. Development 127: 3533-42.

108. Sector Agrario. 2011. Lima. MINAG. Internet. 12 junio 2011. Disponible en:

<http://www.minag.gob.pe/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-producci/camelidos-sudamericanos/5.html>

109. Shimajiri Y, Sanke T, Furuta H, Hanabusa T, Nakagawa T, Fujitani Y,

Kajimoto Y, Takasu N, Nanjo K. 2001. A missense mutation of Pax4 gene (R121W) is associated with type 2 diabetes in Japanese. Diabetes 50: 2864-9.

110. Shimomura H, Sanke T, Hanabusa T, Tsunoda K, Furuta H, Nanjo K. 2009.

Nonsense mutation of islet-1 gene (Q310X) found in a type 2 diabetic patient with a strong family history. Diabetes 49: 1597-600.

111. Simmons MA, Meschia G, Makowski EL, Battaglia FC. 1974. Fetal metabolic

response to maternal starvation. Pediatr. Res 8: 830-836.

112. Sorenson R, Parsons J. 1985. Insulin secretion in mammosomatotropic tumor-

bearing and pregnant rats: a role for lactogens. Diabetes 34: 337–341.

- 113. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P. 1997.** The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386: 399-402.
- 114. Sosa-Pineda B. 2004.** The gene Pax4 is an essential regulator of pancreatic beta-cell development. *Mol Cells* 18: 289-94.
- 115. Stefan Y, Orci L, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Patel Y, Unger R. 1982.** Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of non-diabetic and diabetic humans. *Diabetes* 31: 694-700.
- 116. Stoffers D, Ferrer J, Clarke W, Habener J. 1997b.** Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 17: 138-9.
- 117. Stoffers D, Heller R, Miller C, Habener J. 1999.** Developmental expression of the homeodomain protein IDX-1 in mice transgenic for an IDX-1 promoter/lacZ transcriptional reporter. *Endocrinology* 140: 5374-81.
- 118. Stoffers D, Zinkin N, Stanojevic V, Clarke W, Habener J. 1997a.** Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene decoding sequence. *Nat Genet* 15: 106-10.
- 119. Surmely J, Guenat E, Philippe J, Dussoix P, Schneiter P, Temler E, Vaxillaire M, Froguel P, Jequier E, Tappy L. 1998.** Glucose utilization and production in patines with maturity-onset diabetes of the young caused by a mutation of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene. *Diabetes* 47: 1459-63.
- 120. Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor D, Meneses J, Pedersen R, Rubenstein J, German M. 1998.** Mice lacking the homeodomain transcription

factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. Development 125: 2213-21.

- 121. Swenne I. 1992.** Pancreatic beta-cell growth and diabetes mellitus. Diabetologia 35: 193-201.
- 122. Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, Shiga K, Yonemura Y, Tochino Y, Okamoto H. 1988.** A novel gene activated in regenerating islets. J Biol Chem 263: 2111-4.
- 123. Tornquist S, Cebra C, Van Saun R, Smith B. 2001.** Metabolic changes and induction of hepatic lipidosis during feed restriction in llamas. Am J Vet Res 62 (7): 1081–1087.
- 124. Vaillant C, Lund P. 1986.** Distribution of glucagons-like peptide I in canine and feline pancreas and gastrointestinal tract. Histochem Cytochem. 34: 1117-21.
- 125. Van Saun R. 2006.** Nutrient requirements of South American camelids: A factorial approach. Small Ruminant Research 61 : 165–186.
- 126. Vanhooose A, Samaras S, Artner I, Henderson E, Hang Y, Stein R. 2008.** MafA and MafB regulate Pdx1 transcription through the Area II control region in pancreatic beta cells. J Biol Chem 283: 22612-9.
- 127. Volk B, Wellman K. 1985.** Historical review. The diabetic pancreas. New York: Plenum. 1-16 p.
- 128. Wang J, Cortina G, Wu S, Tran R, Cho J, Tsai M, Bailey T, Jamrich M, Ament M, Treem W, Hill I, Vargas J, Gershman G, Farmer D, Reyern L, Martin M. 2006.** Mutant neurogenin-3 in congenital malabsorptive diarrhea. N Engl J Med 355: 270-80.

- 129. Wang C. 1995.** Insulin-stimulated glucose uptake in rat diaphragm during postnatal development: lack of correlation with the number of insulin receptors and of intracellular glucose transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3621-3625.
- 130. Watanabe T, Yaegashi H, Koizumi M, Toyota T, Takahashi T. 1999.** Changing distribution of islets in the developing human pancreas: A computer-assisted three-dimensional reconstruction study. *Pancreas*. 18: 349-54.
- 131. Wells J, Melton D. 2000.** Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 127: 1563-72.
- 132. Wenslau J, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar S, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth G, Jensen J, Davidson H, Hutton J. 2007.** The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 104: 17040-5.
- 133. Wiebe P, Kormish J, Roper V, Fujitani Y, Alston N, Zaret K, Wright C, Stein R, Gannon M. 2007.** Ptf1a binds to and activates area III, a highly conserved region of the Pdx1 promoter that mediates early pancreas-wide Pdx1 expression. *Mol Cell Biol* 27: 4093-104.
- 134. Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. 2002.** The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Reg Peptides* 107: 63-69.
- 135. Wierup N, Yang S, McEvelly RJ, Mulder H, Sundler F. 2004.** Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J Histochem Cytochem* 52:301–310

- 136. Wilkening RB, Meschia G. 1983.** Fetal oxygen uptake, oxygenation, and acidbase balance as a function of uterine blood flow. *Am J Physiol* 244: 749-755.
- 137. Xu G, Stoffers D, Habener J, Bonner-Weir S. 1999.** Exendin-4 stimulates both β -cell replication and neogenesis, resulting in increased β -cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48:2270–2276.
- 138. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki P, Menzel S, Cox N, Fajans S, Signorini S, Stoffel M, Bell G. 1996.** Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384: 458-60.
- 139. Zaret K. 2008.** Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nat Rev Genet* 9: 329-40.
- 140. Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M, Eski R, Harada A, Shimohata H, Oishi H, Hamada M, Morito N, Hasegawa K, Kudo T, Engel JD, Yamamoto M, Takahashi S. 2005.** MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol* 25: 4969-76.
- 141. Zhang L, Long NM, Hein SM, Ma Y, Nathanielsz PW, Ford SP. 2011.** Maternal obesity in ewes results in reduced fetal pancreatic β -cell numbers in late gestation and decreased circulating insulin concentration at term. *Domest Anim Endocrinol* 40:30–39.
- 142. Zhou Q, Law A, Rajagopal J, Anderson W, Gray P, Melton D. 2007.** A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell* 13: 103-14.